

Der Einfluß
von Cholezystokinin und Gastrin
auf die Kallikreinsekretion
der Parotis

Josef Richter

Duss
München
1904



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0113

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II DES KLINIKUMS GROSSHADERN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. G. PAUMGARTNER

DER EINFLUSS VON CHOLEZYSTOKININ UND GASTRIN AUF DIE
KALLIKREINSEKRETION DER PAROTIS

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Richter
aus
Altstädten
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. Mann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 1984

Herrn Prof. Dr. H.-J. Karl danke ich für die Überlassung des Themas und für seine wohlwollende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. K.Mann für die Betreuung der experimentellen Arbeiten und die zahlreichen Ratschläge und Hilfen bei der Auswertung und der Zusammenfassung des vorliegenden Materials.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H.Eichner von der HNO-Klinik der Universität München für zahlreiche Anregungen und Hilfen bei der Durchführung der Arbeiten.

Für die technische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft danke ich Frau B.Keipert stellvertretend für alle Mitarbeiter des Forschungslabors.

Dieser Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. K.Hochstrasser vom HNO-Forschungslabor der Universität München und seinen Mitarbeitern, ganz besonders Herrn Dr. Schönberger.

Allen freiwilligen Versuchspersonen bin ich zu größtem Dank verpflichtet, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
II. <u>Material</u>	
1. Biologische Präparate	5
2. Reagenzien	5
3. Puffer	5
4. Geräte	5
III. <u>Wirkungsweise der verwendeten Hormone</u>	6
IV. <u>Versuchsanordnung</u>	7
V. <u>Methodik</u>	
1. Bestimmung der Flußraten und der pH-Werte	8
2. Gesamtproteinbestimmung	9
3. Amylasebestimmung	10
4. Bestimmung der enzymatischen Kallikrein-Aktivität	11
5. Radioimmunologische Bestimmung der Kallikrein-Konzentration	11
VI. <u>Statistische Verfahren</u>	
1. Berechnung der Korrelation zwischen Radioimmunoassay und Enzymassay	12
2. Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben	12
VII. <u>Ergebnisse</u>	
1. Flußraten und pH-Werte des Parotisspeichels	13
2. Gesamtproteinausscheidung im Parotisspeichel	14

	Seite
3. Enzymatische Untersuchungen des Parotisspeichels	
3.1 Amylasebestimmungen	17
3.2 Kallikreinbestimmungen mit dem Substrat S-2266 von KABI	21
4. Radioimmunologische Untersuchungen der Kallikreinkonzentrationen unter Ruhe- und Reizbedingungen	24
5. Einzelbeispiele der Parotissekretion von Kallikrein und Amylase in Ruhe und nach Reiz	27
6. Korrelation zwischen enzymatischer und radioimmunologischer Kallikreinbestimmung	31
<u>VIII. Diskussion</u>	33
<u>IX. Zusammenfassung</u>	36
<u>X. Literaturverzeichnis</u>	37
<u>XI. Lebenslauf</u>	46

I. Einleitung und Fragestellung

Schon Pawlow konnte experimentell die kephale Steuerung des Speichelflusses beim Hund nachweisen (41). Seitdem wurden viele neue Erkenntnisse über die nervalen Regulationsmechanismen der Speichelbildung gewonnen (20, 46). So wurde gezeigt, daß die Innervation nicht nur unter verschiedenen Tierspezies variiert, sondern auch die einzelnen Speicheldrüsen (Parotis, Gl. submandibularis und Gl. sublingualis) und sogar die einzelnen Zelltypen innerhalb derselben Drüse ein unterschiedliches Innervationsmuster aufweisen.

Dies erklärt beispielsweise das verschiedene Sekretionsverhalten unter gleichen Stimulationsbedingungen bei verschiedenen Tierarten.

Es gilt heute als sicher, daß die Proteinsynthese und -sekretion an der Parotis durch das sympathische Nervensystem über β -adrenerge Rezeptoren an den Azinuszellen beeinflußt wird (2). Die Ausscheidung von Kalium wird azinär über einen α -adrenergen Mechanismus gesteuert. Wasser, Natrium- und Chloridgehalt des Speichels werden durch cholinerg beeinflusste Filtrationsvorgänge in den Drüsenausführungsgängen (Streifenstücke) reguliert (50).

Das Parotisdrüsenpaar ist die Hauptbildungsstätte der Amylase mit 70% der gesamten Speichelamylase.

Hinsichtlich der Sekretion der Amylase besteht möglicherweise eine funktionelle Beziehung zwischen Parotis und Pankreas. Biochemisch handelt es sich aber um zwei unterschiedliche Isoenzyme.

Ein ähnliches Sekretionsverhalten von Amylase und Bikarbonat im Parotis- und Pankreassekret war Anlaß der Frage nachzugehen, ob Speichelanalysen bei Patienten mit Pankreaserkrankungen einen diagnostisch verwertbaren Parameter für die exokrine Funktion des Pankreas abgeben könnten. Die widersprüchlichen Ergebnisse haben indes noch zu keinem brauchbaren Funktionstest geführt (10, 21, 25, 27, 36, 37, 38).

Eine morphologische und funktionelle Ähnlichkeit beider Drüsen konnte Kakizaki bei der Ratte nachweisen. Ferner beobachtete er eine Begleitschädigung der Parotis bei experimentell induzierter Pankreatitis (24).

Neuerlich wurde die Proteinzusammensetzung des menschlichen Parotissekretes unter Ruhe- und Reizbedingungen von Eichner untersucht und Normalwerte für Enzyme und Elektrolyte des Parotisspeichels unter standardisierten Bedingungen der Sekretgewinnung definiert (11, 12, 13).

Der Einfluß von Hormonen auf die Speichelsekretion ist dagegen noch weitgehend unbekannt, obwohl bereits um die Jahrhundertwende die Parotisschwellung beim Diabetes mellitus klinisch beobachtet wurde.

Eine Studie aus dem Jahr 1973 zeigte bei Diabetikern eine Vermehrung des Ruhespeichels mit gleichzeitiger Abnahme von Eiweißgehalt und Elektrolyten (52). Unter ACTH und Cortison wurde, ähnlich der α -adrenergen Stimulation, eine Steigerung der Kaliumsekretion nachgewiesen (43). Vermehrte Natriumrückresorption und gesteigerte Kaliumausscheidung durch Aldosteron wurden von Mangos beschrieben (31).

Auch Sexualhormone (und Ovulationshemmer) sollen eine Veränderung der Speichelzusammensetzung bewirken (33, 45).

Die Entdeckung des Amin precursor uptake decarboxylation -(APUD)-Systems-endokrin aktiver Zellen- lenkte dann die Aufmerksamkeit vermehrt auf eine möglicherweise hormonelle Steuerung auch der Speicheldrüsen. Diese Zellen, zu denen unter anderem auch die α - und die β -Zellen der Langerhansschen Inseln, sowie die argyrophilen und enterochromaffinen Zellen des Dünndarms gerechnet werden, sind im gesamten Gastrointestinaltrakt verstreut und bilden Hormone, die sich sowohl als Stimulatoren der Magen- (Gastrin) und Pankreassekretion (Sekretin, Cholezystokinin-Pankreozymin) als auch als Hemmsubstanzen der Magen- (Sekretin, Somatostatin) und Pankreassekretion (Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid, Glukagon) erwiesen (42).

Eine frühere Arbeit von Clendinnen, B.G. et al. konnte zwar bei Hunden keine Beeinflussung der Speichelsekretion durch gastrointestinale Hormone nachweisen (7), später berichtete jedoch Mulcahi beim Menschen von einem Anstieg der Speichelamylase nach i.v. Gabe von Sekretin und Cholezystokinin-Pankreozymin (35). Malfertheiner, P. et al. zeigten 1980, daß sowohl Sekretin und Cholezystokinin-Pankreozymin als auch Gastrin einen statistisch signifikanten Anstieg der Speichelamylase verursachte (29). Die gleiche Arbeitsgruppe wies dann einen signifikanten Anstieg von Amylase- und Proteingehalt der Parotis nach Gabe von Sekretin und Ceruletid (dem Cholezystokinin-Pankreozymin vergleichbar) nach, Flußraten und Elektrolytkonzentrationen blieben dagegen unbeeinflusst (30).

Spezifische Proteasen konnten bisher im Speichel nicht bestimmt werden. Eine Serinproteinase, das Kallikrein, kommt in den Speicheldrüsen in hoher Konzentration vor. Es vermag wie die anderen Organkallikreine aus dem endogenen Substrat Kininogen die eigentlich biologisch wirksame Substanz, das Dekapeptid Kallidin freizusetzen (39, 53, 55, 56).

Pharmakologisch bewirken die Kinine Kallidin und Bradykinin eine Kontraktion glatter Muskeln, z.B. von Darm und Uterus, dilatieren Arteriolen, erhöhen die Gefäßpermeabilität und beeinflussen sowohl Transportmechanismen an Membranen, als auch den Zellmetabolismus (56).

Ein Teil der Wirkungen wird wahrscheinlich über Prostaglandine vermittelt (53). Auch eine Vermittlung über zyklische Nukleotide wurde nachgewiesen. Die physiologische Rolle der Organkallikreine ist aber noch nicht ausreichend geklärt (28, 39, 44, 56).

Parotiskallikrein ist nach immunhistologischen Studien im Gangsystem, und zwar in den Zellen der Streifenstücke lokalisiert (40), wo es in enzymatisch aktiver Form vorliegt (19). Seine nervale Freisetzung über einen parasympathischen und α -adrenergen Mechanismus ist bekannt (40). Ob jedoch auch eine hormonelle Steuerung der Kallikreinsekretion existiert ist ungeklärt.

In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob gastrointestinale Hormone, Gastrin und Cholezystokinin-Pankreozymin, auch die Sekretion von Parotiskallikrein beeinflussen können.

Methodische Voraussetzungen für diese Untersuchungen waren neue Bestimmungsmethoden für Organkallikrein, wie der Radioimmunoassay (32) und der Substratassay mit dem Substrat H-D-Val-Leu-Arg-NHNp (5, 6), die eine spezifische Quantifizierung erlauben.

II. Material

1.) Biologische Präparate

Pentagastrin, Gastrodiagnost^R Fa. Merck Darmstadt 47047
Cholezystokinin 75 I.D.U. Kabi Diagnostica
Stockholm

Pool-Serum wurde freundlicherweise von
Professor Dr. K. Hochstrasser, HNO-Forschungs-
labor der Universität München, zur Verfügung
gestellt.

Parotisspeichel wurde durch Kanülierung der
Ohrspeicheldrüsen gewonnen.

2.) Reagenzien

Biuret Farblösung Fa. Merck Darmstadt 14039
Merckotest α -Amylase: Fa. Merck Darmstadt 3301
Puffersubstrat
0,2g/1000ml Amylose, 15mmol/l NaCl,
20mmol/l Phosphatpuffer pH 7,1
Farbreagenz: 0,008N Jodlösung
Kallikrein spezifisches Substrat S-2266 Kabi Diagnostica
H-D-Val-Leu-Arg-NH-~~Q~~-NO₂. 2HCl 4mmol/l. Stockholm

3.) Puffer

0,05mol/l C₄H₁₁NO₃, NaCl, HCl pH 9,0

4.) Geräte

Beckman Spektrophotometer Modell 24 mit Schreiber
Perkin Elmer UV - Vis Spektrophotometer 554 mit Schreiber
Eppendorf Photometer
pH-Meter E 512, Metrohm Herisau
Mikro-pH-Einstabmeßkette, Typ 406/M6, Fa. Ingold
Zentrifuge, Hettich, Rotanta/K
Wasserbad, Fa. B. Braun Melsungen AG

Materialien des Radioimmunoassays

Es wurden die gleichen Materialien und Geräte wie in
der Arbeit von Mann, K. et al. verwendet (32).

III. Wirkungsweise der verwendeten Hormone

Gastrin ist ein aus 17 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das in den G-Zellen des Antrums gebildet wird.

Eine wesentliche Wirkung des Gastrins ist die Stimulation der Parietalzellen, und zwar sowohl direkt als auch über eine Sensibilisierung gegenüber vagalen Sekretionsreizen. Eine weitere praktisch wichtige physiologische Wirkung von Gastrin ist die Kontraktion oder die Tonosierung des glatten Muskels im Bereich des unteren Ösophagussphinkters und der kardianahen Fundusmuskulatur (49).

Das im Versuch verwendete Pentagastrin (Gastrodiagnost^R, Fa. Merck Darmstadt) enthält die biologisch wirksame C-terminale Vierersequenz der Aminosäuren Tryptophan-Methionin-Asparagin und Phenylalanin des Hormons Gastrin. Pankreozymin, ein Hormon, das die Enzymsekretion des Pankreas steigert, und daher seinen Namen erhielt, ist nach neueren Untersuchungen identisch mit dem Hormon Cholezystokinin, das eine Kontraktion der Gallenblase hervorruft (17, 23), wegen dieser Doppelwirkung wurde die Bezeichnung Cholezystokinin-Pankreozymin gewählt.

Durch kinetische und histochemische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Cholezystokinin-Pankreozymin im Pankreas die Entleerung von Zymogengranula in das Lumen der Azini fördert. Außerdem steigert es die Enzymsynthese möglicherweise über einen intrazellulären Angriffspunkt an den Phospholipidmembranen des endoplasmatischen Retikulums. Hier verstärkt es die Inkorporation von ³²P und erleichtert den Durchtritt von Enzymen in das endoplasmatische Retikulum, wie am Beispiel der Amylase gezeigt werden konnte (22).

IV. Versuchsanordnung

Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, daß die individuelle Variationsbreite der Speichelzusammensetzung abhängig ist von Alter, Geschlecht, Tageszeit (Zirkadianschwankungen), aber auch von Erkrankungen wie Stoffwechselstörungen und psychologischen Faktoren (1, 8, 9, 15, 16).

Um von definierten Bedingungen für die Sekretgewinnung ausgehen zu können, wählten wir für unsere Versuche freiwillige männliche, gesunde Probanden im Alter von 23 - 25 Jahren aus, die vorher eingehend über die Untersuchung aufgeklärt wurden.

Die Durchführung des Versuches war von der Ethikkommission München, unter Vorsitz von Professor Riecker, genehmigt.

Bei insgesamt acht Versuchspersonen wurde der Ductus parotideus sondiert und Parotisspeichel gewonnen. Zunächst wurden 3x 10 Minuten-Portionen Basalsekret gewonnen, dann erfolgte die Stimulation mit Cholezystokinin 1 I.U./kg Körpergewicht intravenös, das Reizsekret wurde in 10 Minuten Fraktionen eine Stunde lang gesammelt.

Mit wiederum acht Probanden, wobei fünf bereits am ersten Versuch teilgenommen hatten, wurde an einem getrennten Tag, bei gleicher Versuchsanordnung, die Stimulation mit Penta-gastrin (Gastrodiagnost^R) 6 µg/kg Körpergewicht subcutan durchgeführt.

V. Methodik

1.) Bestimmung der Flußraten und der pH-Werte

Nach Sondierung des Ductus parotideus und Fixieren eines Polyvinylkatheters mit einem Gesamtdurchmesser von 1 mm bei einem inneren Durchmesser von 0,5 mm wurde das abtropfende Sekret in graduierten Zentrifugengläsern in 10 Minuten Fraktionen gesammelt und das Volumen bestimmt.

Der pH-Wert der einzelnen Fraktionen wurde mittels eines pH-Meters und einer Mikro-pH-Einstabmeßkette bestimmt.

2.) Gesamtproteinbestimmung

Prinzip: Aromatische Aminosäuren zeigen ein Extinktionsmaximum bei 280 nm (3, 57).

10 µl Speichel und 3 ml Aqua dest. wurden in einer Küvette sorgfältig gemischt, danach wurde am Spektrophotometer Perkin-Elmer das Absorptionsmaximum bei 280 nm gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Als Standard diente Humanserum, das in einer Vorverdünnung von 1:10 in gleicher Weise am Spektrophotometer eingesetzt und gemessen wurde, nachdem bereits seine Proteinkonzentration mittels der Biuret-Methode (47, 54) am Eppendorf-Photometer bei 546 nm bestimmt worden war.

Der Vergleich der Absorptionsmaxima von Speichel und von Serum ergab die Proteinkonzentration der Speichelproben.

3.) Amylasebestimmung

- Jodstärketest nach MERCK

Prinzip: α -Amylase baut Stärke zu reduzierenden Zuckern ab. Dabei wird unter Zugabe einer bestimmten Stärkemenge, nach Einwirken von Amylase, die verbliebene Menge Stärke durch die Jodstärkereaktion bestimmt (18, 51).

Durchführung: Der Speichel wurde 500fach verdünnt eingesetzt.

1 ml Puffersubstratlösung wurde mit 0,01 ml der verdünnten Speichelprobe gemischt, und diese Lösung wurde 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Dann wurden 10 ml Aqua dest. und 0,5 ml der Farblösung hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen konnte nach 10 Minuten die Extinktion gegen Aqua dest. bei 620 nm gemessen werden.

4.) Bestimmung der enzymatischen Kallikrein-Aktivität

Prinzip: Speichel-Kallikrein spaltet das Substrat H-D-Val-Leu-Arg-pNA, wobei p-Nitroanilin freigesetzt wird, dessen Menge linear mit der Kallikrein-Konzentration der Probe ansteigt. p-Nitroanilin wird bei E 405 nm bestimmt.

Durchführung: Die Speichelproben wurden 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und 10 Minuten lang bei 2.000 g zentrifugiert. Danach wurden in Semimikroküvetten hintereinander einpipettiert:

0,7 ml Puffer und

0,1 ml 1:1 verdünnter Speichel.

Nach sorgfältiger Durchmischung wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Danach wurde 0,2 ml Substrat (2,2 mg/ml) zugegeben, sorgfältig gemischt, und die Extinktionsänderung bei 405 nm (Absorptionsmaximum von p-Nitroanilin) am Beckmann-Spektrophotometer ermittelt und mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Die Kallikreinkonzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$U/l = 2095 \times \Delta E/\text{min.}$$

5.) Radioimmunologische Bestimmung der Kallikreinkonzentration

Organkallikrein wurde radioimmunologisch nach Mann, K. et al. (32) bestimmt.

Die Speichelproben wurden dabei in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt.

VI. Statistische Verfahren

In Zusammenarbeit mit Herrn Dierschedl und Herrn Kampe vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München kamen folgende statistische Verfahren zur Anwendung (48):

- 1.) Berechnung der Korrelation zwischen Radioimmunoassay und Enzymassay:
 - a) Berechnung des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten.
 - b) Lineare Regression
mit Berechnung der Regressionsgeraden
und des Korrelationskoeffizienten.
- 2.) Wilcoxon - Test für verbundene Stichproben bei zweiseitiger Betrachtungsweise, zur Berechnung der Signifikanz der Unterschiede von stimulierten Meßwerten und Basalwerten.

VII. Ergebnisse

1.) Flußratenbestimmungen und pH-Werte des Parotisspeichels

Die Ruhesekretion der Ohrspeicheldrüsen lag bei den untersuchten Probanden bei 0,03 bis 0,15 ml/min/Drüse. Bei Stimulation sowohl mit Pentagastrin in der einen als auch mit Cholezystokinin in der anderen Versuchsreihe ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den Flußraten.

Auch bei den pH-Werten ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede vor und nach den beiden Stimulationen. Die pH-Werte lagen zwischen 5,2 und 7,4, wobei mit steigenden Flußraten die Speichel-pH-Werte sich an den Serum-pH-Wert annäherten.

2.) Gesamtproteinausscheidung im Parotisspeichel

Die Gesamtproteinmenge der Ruhesekrete lag bei 0,27 bis 0,92 mg/min/Drüse.

Nach Stimulation mit Pentagastrin ergab sich keine signifikante Änderung der Konzentration und auch nicht der Proteinmenge (Abb. 1).

Wurde dagegen mit Cholezystokinin stimuliert, so ergab sich eine signifikante Steigerung sowohl der Proteinkonzentration ($p < 0,05$) als auch der Proteinmenge ($p < 0,01$, Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, zweiseitige Betrachtung) (Abb. 2, Tab. 1).

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	0,36	0,27	0,50	0,32	0,36	0,27	0,32	0,66
x-stimuliert	0,52	0,46	0,65	0,50	0,69	0,40	0,44	0,84

Tab. 1: Basale und stimulierte Werte der Gesamtproteinausscheidung (mg/min), Stimulation mit Cholezystokinin, n=8

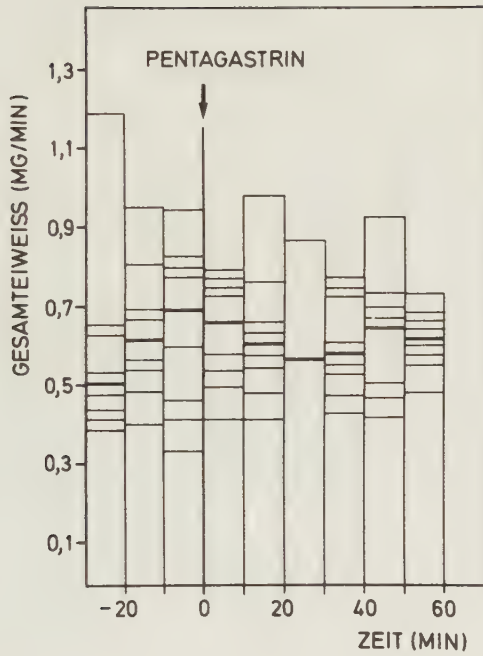


Abb.1: Gesamteiweißmenge basal und nach Stimulation mit Pentagastrin, n = 8, — Median

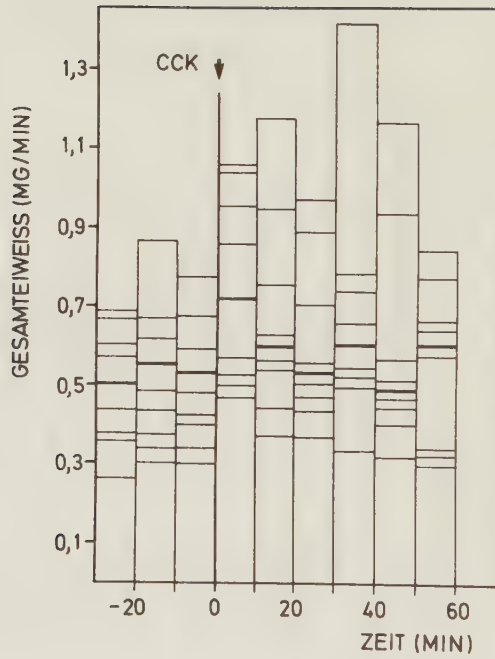


Abb.2: Gesamteiweißmenge basal und nach Stimulation
mit Cholezystokinin
n = 8, — Median, $p < 0,01$

3.) Enzymatische Untersuchungen des Parotisspeichels unter Ruhe- und Reizbedingungen

3.1 Amylasebestimmungen

Die Menge im Ruhesekret lag bei
2,4 bis 25 U/min/Drüse.

Nach Stimulation mit Pentagastrin ergab sich ein
signifikanter Anstieg sowohl der Menge
von $\bar{x}$ 7,3 U/min auf $\bar{x}$ 12,3 U/min (Abb.3, Tab.2)
als auch der Konzentration ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test
für verbundene Stichproben, zweiseitige Betrachtung,
 $\bar{x}$: Median).

Auch nach Cholezystokinin-Stimulation ergab sich ein
signifikanter Anstieg der Menge
von $\bar{x}$ 4,9 U/min auf $\bar{x}$ 13,7 U/min (Abb.4, Tab.3)
und der Konzentration ($p < 0,01$, obiger Test).

Der Quotient Amylase/Eiweiß (U/mg) stieg nach
beiden Stimulationen signifikant an
($p < 0,05$, obiger Test, Tab.4; 5).

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	4,8	4,0	10,2	18,1	10,2	8,0	5,8	6,5
x-Stimuliert	12,0	16,7	12,6	16,7	15,5	10,1	11,7	12,0

Tab. 2: Basale und stimulierte Werte der Amylasemenge
(U/min), Stimulation mit Pentagastrin, n = 8

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	8,2	4,6	18,1	2,4	5,1	7,5	4,7	4,5
x-stimuliert	16,0	14,5	24,5	10,9	8,7	14,5	12,8	6,5

Tab. 3: Basale und stimulierte Werte der Amylasemenge (U/min), Stimulation mit Cholezystokinin, n = 8

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	6,9	7,6	22,0	46,5	21,0	8,9	8,9	38,0
x-stimuliert	32,8	33,3	38,0	42,7	43,0	17,0	17,0	50,6

Tab. 4: Basale und stimulierte Werte der Quotienten Amylase/Gesamteiweiß (U/mg), Stimulation mit Pentagastrin, n = 8

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	22,8	17,0	36,2	7,5	14,2	27,8	14,7	6,8
x-stimuliert	30,8	31,5	37,7	21,8	12,6	36,3	29,1	7,7

Tab. 5: Basale und stimulierte Werte der Quotienten Amylase/Gesamteiweiß (U/mg), Stimulation mit Cholezystokinin, n = 8

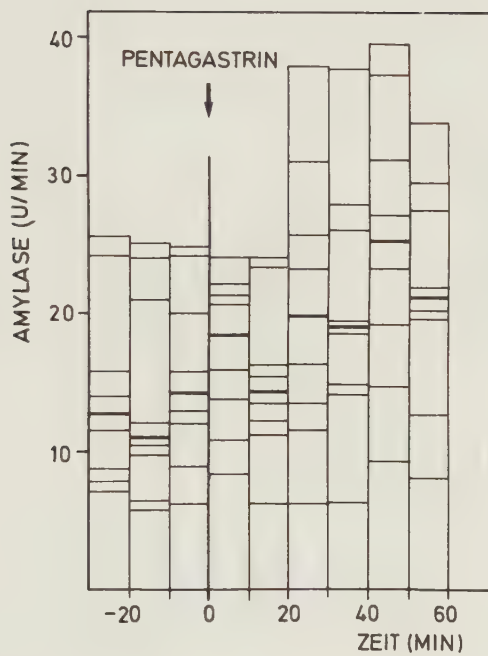


Abb.3: Amylasemenge basal und nach Stimulation mit Pentagastrin
n = 8, — Median, $p < 0,05$

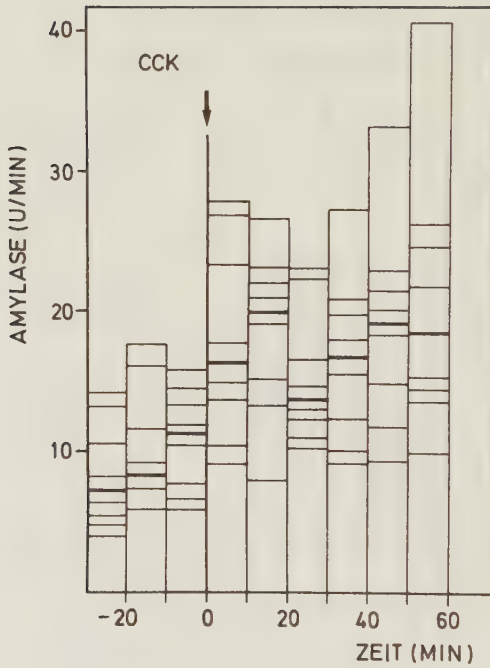


Abb.4: Amylasemenge basal und nach Stimulation
mit Cholezystokinin
 $n = 8$, — Median, $p < 0,01$

3.2 Kallikreinbestimmung mit dem Substrat S-2266 von KABI

Es fanden sich Ruhewerte zwischen 0,8 und 3,9mU/min/Drüse.

Nach Pentagastrinstimulation ergab sich weder eine signifikante Änderung der Kallikreinmenge (Abb. 5), noch der Konzentration.

Wurde mit Cholezystokinin stimuliert, so ergab sich sowohl bei der Konzentration als auch bei der Menge (Abb. 6, Tab. 6) ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, zweiseitige Betrachtung).

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	1,6	1,5	1,6	1,1	1,6	2,2	2,9	1,3
x-stimuliert	3,6	2,8	2,1	2,9	3,3	2,9	4,3	2,2

Tab. 6: Basale und stimulierte Werte der Kallikreinmenge (mU/min), Stimulation mit Cholezystokinin, n = 8

Berechnet man den Quotienten Kallikrein / Eiweiß (mU/mg), so ergab sich bei beiden Stimulationen kein signifikanter Anstieg.

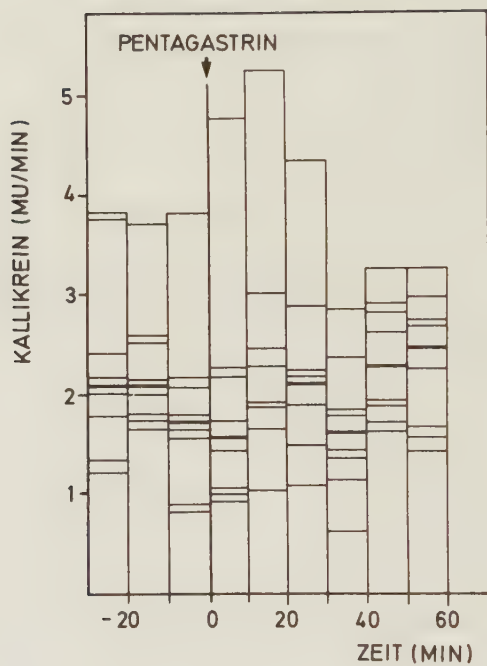


Abb.5: Kallikreinmenge basal und nach Stimulation
mit Pentagastrin
n = 8, — Median

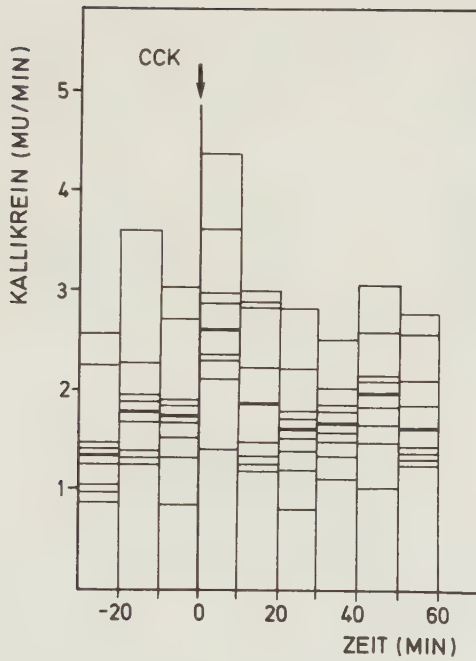


Abb.6: Kallikreinmenge basal und nach Stimulation
mit Cholezystokinin
n = 8, — Median, $p < 0,05$

4.) Radioimmunologische Untersuchungen der Kallikrein-Konzentration unter Ruhe- und Reizbedingungen

Die Ruhewerte lagen zwischen 35 und 440 ng/min/Drüse. Die Pentagastrinstimulation brachte weder einen signifikanten Anstieg der Menge (Abb. 7) noch der Konzentration.

Nach Cholezystokininstimulation ergab sich sowohl bei der Konzentration ($p < 0,01$) als auch bei der Menge (Abb. 8, Tab. 7) ($p < 0,05$) ein signifikanter Anstieg (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, zweiseitige Betrachtung).

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
x-basal	112	128	323	105	172	177	201	101
x-stimuliert	306	330	504	276	243	263	372	179

Tab. 7: Basale und stimulierte Werte der Kallikreinmenge (ng/min), Stimulation mit Cholezystokinin, n = 8

Kein signifikanter Anstieg nach beiden Stimulationen ergab sich für den Quotienten Kallikrein/Eiweiß (ng/mg).

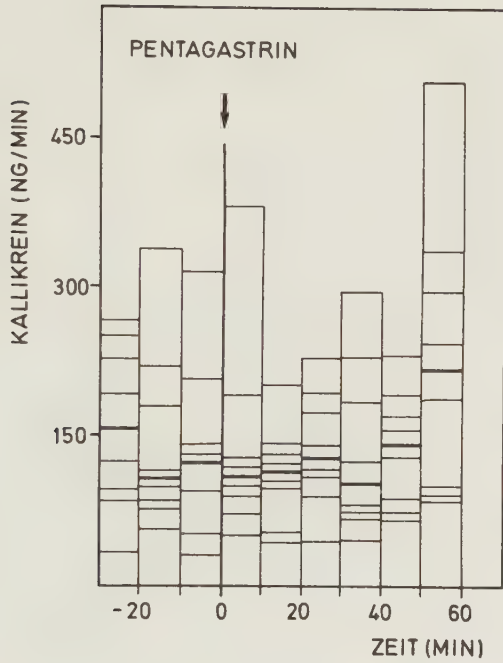


Abb.7: Kallikreinmenge basal und nach Stimulation mit Pentagastrin, n = 8, — Median

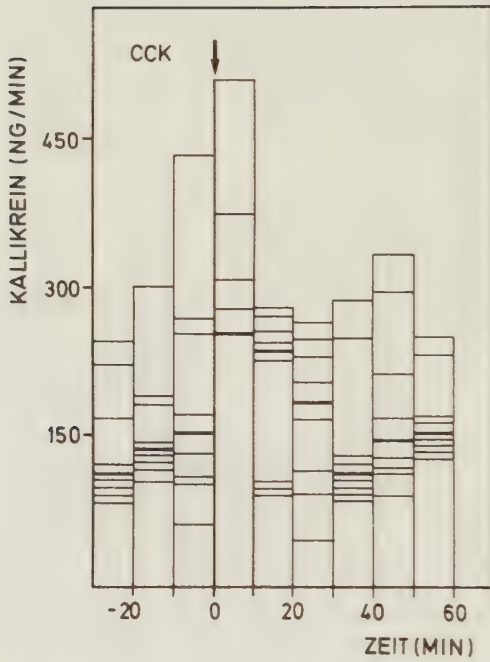


Abb.8: Kallikreinmenge basal und nach Stimulation mit Cholezystokinin, $n = 8$, — Median, $p < 0,05$

5.) Einzelbeispiele der Parotissekretion von
Kallikrein und Amylase in Ruhe und nach Reiz

Wegen der großen interindividuellen Streuung der
Kallikrein- und Amylasemenge pro Zeiteinheit sind
Einzelanalysen aufschlußreicher als der Vergleich
der Mittelwerte des Kollektivs (Abb. 9, 10, 11, 12).

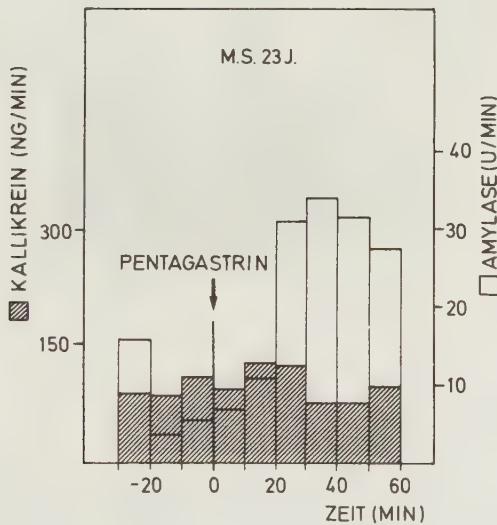


Abb.9: Amylase- und Kallikreinmenge basal und nach
Stimulation mit Pentagastrin, Proband M.S.,
23 Jahre

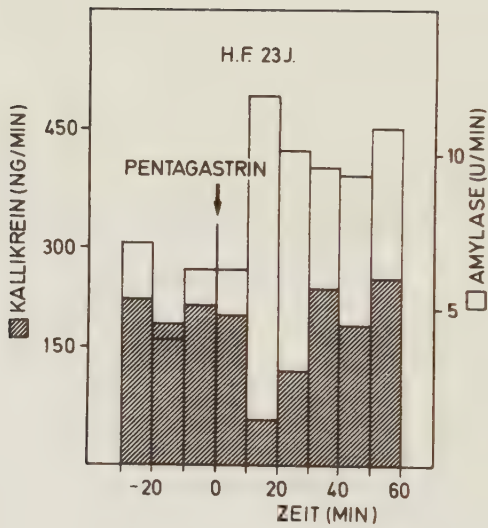


Abb.10: Amylase- und Kallikreinmenge basal und nach Stimulation mit Pentagastrin, Proband H.F., 23 Jahre

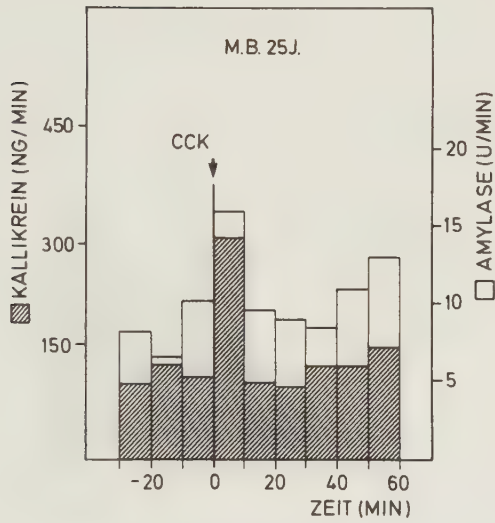


Abb.11: Amylase- und Kallikreinmenge basal und nach Stimulation mit Cholezystokinin, Proband M.B., 25 Jahre

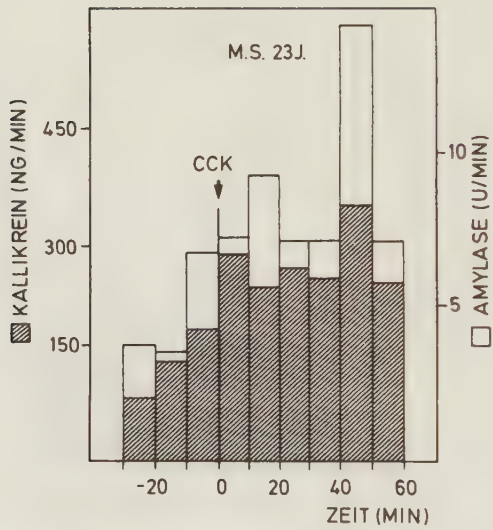


Abb.12: Amylase- und Kallikreinmenge basal und nach Stimulation mit Cholezystokinin, Proband M.S., 23 Jahre

6.) Korrelation zwischen enzymatischer und radioimmunologischer Kallikreinbestimmung

Für die Bestimmung der Korrelation wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient berechnet, der keine Normalverteilung zur Voraussetzung hat.

Der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient r_s betrug 0,4898 bei $p \leq 0,001$; d.h. es bestand eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Bestimmungsmethoden.

Zum Vergleich wurde zusätzlich der Korrelationskoeffizient mittels der linearen Regression bestimmt, dieser betrug 0,4828 .

Die Gleichung der Regressionsgeraden lautete:
Radioimmunoassay = $2,0344 + 0,1608 \times \text{Enzymassay}$
(Abb.13).

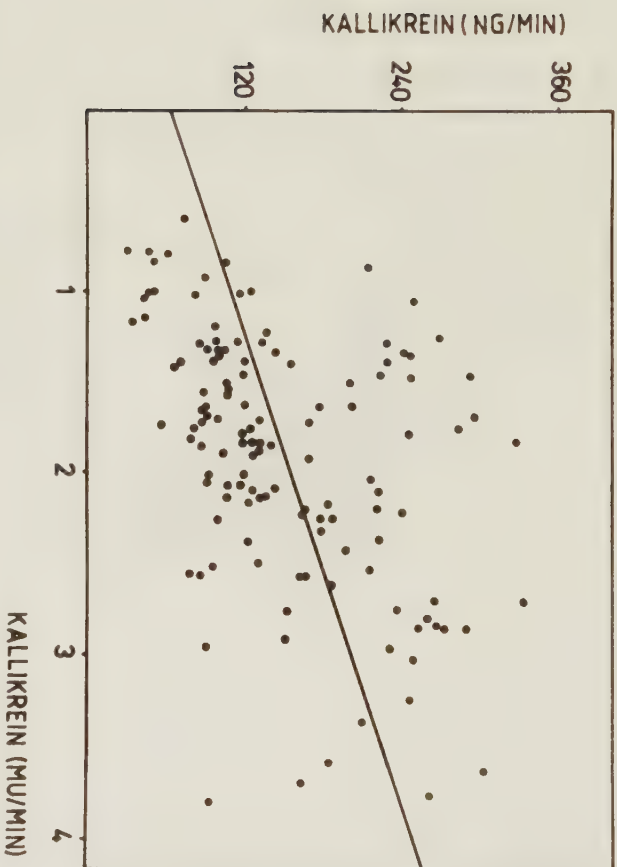


Abb. 13: Darstellung der Korrelation zwischen Radioimmunoassay und Enzymassay,
Gleichung der Regressionsgeraden:
Radioimmunoassay = $2,0344 + 0,1608 \times$ Enzymassay
Korrelationskoeffizient: 0,4828

VIII. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen deutlich einen Einfluß der Hormone Gastrin und Cholezystokinin-Pankreozymin auf das Sekretionsverhalten der Parotis.

Gastrin führt zu einem alleinigen Anstieg der Amylasekonzentration um 135% über die Basalwerte, alle anderen Meßgrößen zeigen keine signifikanten Änderungen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Arbeit von Malfertheiner, P. et al. (29).

Cholezystokinin-Pankreozymin Stimulation führt zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen von Amylase (158%), Gesamteiweiß (60%) und Kallikrein (102% bei enzymatischer Bestimmung, 122% bei Bestimmung mittels Radioimmunoassay), Flußraten und pH-Werte blieben konstant.

Diese Steigerung der Enzymaktivität läßt sich mit der Wirkung dieses Hormons am exokrinen Pankreas vergleichen (17, 23). Der Amylase- und Proteinanstieg nach Cholezystokinin-Pankreozymin Gabe war ebenfalls mit den Befunden von Malfertheiner, P. et al. im Jahre 1981 zu vergleichen (30).

Der Quotient Kallikrein/Protein zeigte jedoch keinen signifikanten Anstieg, d.h. der Kallikreinanstieg nach Hormonstimulation ist nicht spezifisch, sondern als Folge der vermehrten Proteinausscheidung zu werten.

Kallikrein wurde in unseren Versuchen mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen, einmal die enzymatische Aktivität mit dem Enzymassay S-2266 von KABI (6), zum anderen die Konzentration mit dem Radioimmunoassay von Mann, K. et al. (32).

Der Vergleich dieser Methoden zeigt, daß sie beide signifikant korrelieren; der mittlere Anstieg der enzymatischen Esteraseaktivität ist jedoch etwas geringer (102% über basal) als der mittlere Konzentrationsanstieg (122% über basal).

Das im Vergleich zur Amylase unterschiedliche Sekretionsverhalten von Kallikrein auf hormonelle Stimuli-Anstieg nach Cholezystokinin-Pankreozymin Stimulation, keine Änderung dagegen nach Stimulation mit Gastrin-hat eine mögliche Erklärung in der besonderen zellulären Lokalisation und nervalen Sekretionssteuerung von Kallikrein in der Parotis.

Während die α -Amylase in den Azinuszellen lokalisiert ist (26), befindet sich Kallikrein in der Zellen der Streifenstücke des Gangsystems (40).

Die Amylasesekretion der Parotis wird parasymphatisch und über β -adrenerge Rezeptoren an den Azinuszellen beeinflusst (2, 11), die Kallikreinsekretion dagegen über α -adrenerge und ebenfalls parasymphatische Stimulation (40, 14).

Das Wissen um die unterschiedliche Beeinflußbarkeit der beiden Enzyme macht ihr verschiedenes Sekretionsverhalten nach Stimulation mit Gastrin und Cholezystokinin-Pankreozymin verständlicher.

Wegen des recht geringen Kallikreinanstiegs nach nervaler Stimulation der Parotis diskutierte T.B.Orstavik 1978 den Einfluß anderer Faktoren auf die Kallikreinsekretion (40). Zu ihnen gehören möglicherweise gastrointestinale Hormone, wobei der von Cholezystokinin-Pankreozymin hier erstmals belegt wurde.

Die Frage, ob aus dem Sekretionsverhalten der Parotis Informationen über den Funktionszustand anderer intestinaler Organe wie dem Pankreas zu gewinnen sind, muß auch nach diesen Untersuchungen offen bleiben.

Zur physiologischen Bedeutung gastrointestinaler Hormone für die Speichelsekretion liegen bislang keine Untersuchungen vor.

In tierischen, nicht aber in menschlichen Speicheldrüsen (4, 34), ist der Nachweis endokrin aktiver Zellen (Glukagon, Renin) erbracht worden.

Tierversuche sind deshalb schon aus dieser Sicht wenig aussagekräftig. Ob andere Hormone die Parotissekretion stimulieren oder hemmen können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

IX. Zusammenfassung

Bisher war nicht bekannt, ob gastrointestinale Hormone, die die pankreatische Enzymsekretion beeinflussen, auch die Enzymsekretion in menschlichen Speicheldrüsen mit steuern. Wir untersuchten deshalb unter definierten Bedingungen, bei acht freiwilligen männlichen Versuchspersonen, das Sekretionsverhalten der Parotis hinsichtlich Speichelvolumen, -pH, Amylase, Gesamteiweiß und Kallikrein unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit 1 I.U./kg Körpergewicht Cholezystokinin, und an einem anderen Tag mit 6 µg/kg Körpergewicht Pentagastrin. Die Kallikreinbestimmung erfolgte mittels eines Radioimmunoassays und zusätzlich mit dem Substrat S-2266 der Firma KABI.

Das Sekret wurde über eine Sonde 9x 10 Minuten lang gesammelt. Nach Stimulation mit Cholezystokinin fand sich ein signifikanter Anstieg der ausgeschiedenen Menge und Konzentration von Amylase, Gesamteiweiß und Kallikrein, Volumen und pH-Werte blieben unverändert. Nach Gabe von Pentagastrin stieg nur die Menge und Konzentration der Amylase im Speichel an, alle anderen Meßgrößen zeigten keine signifikante Änderung. Pentagastrin hat folglich keine Wirkung auf die Kallikreinsekretion der Parotis. Da nach Stimulation mit Cholezystokinin der Quotient Kallikrein/Gesamteiweiß konstant blieb, wird die Kallikreinfreisetzung nicht spezifisch stimuliert, vielmehr erhöht sich die Kallikreinkonzentration als Folge der vermehrten Ausscheidung der gesamten Proteinmenge.

X. Literaturverzeichnis

1. Albegger, K.W.; Müller, O.:
Der tagesrhythmische Sekretionszyklus der Glandula
submandibularis der Ratte.
Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.-u. Kehlk.-Heilk. 204:
27-56, 1973
2. Batzri, C.; Selinger, Z.; Schramm, M.; Robinovitch, M.R.:
Potassium Release Mediated by the Epinephrine
 α -Receptor in Rat Parotid Slices.
J. Biol. Chem. 248: 361 - 368, 1973
3. Bewen, G.H.; Holiday, E.R.:
Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and
Amino Acids.
Adv. Prot. Chem. 7: 319 - 386, 1952
4. Bhatena, S.J.; Smith, S.S.; Voyles, N.R.; Penhos, J.C.;
Recant, L.:
Studies on submaxillary Gland immunoreactive Glucagon.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 74: 1574 - 1581, 1977
5. Claeson, G.; Friberger, P.; Knös, M.; Eriksson, E.:
Methods for Determination of Brekallikrein in
Blasma, Glandular Kallikrein and Urokinase.
Haemostasis 7: 76 - 78, 1978
6. Claeson, G.; Aurell, L.; Karlsson, G.; Gustavson, S.;
Friberger, P.; Arielly, S.; Simonsson, R.:
Design of chromogenic peptide substrates.
In: Chromogenic Peptide Substrates (1979)
Edited by Scully, M.F.; Kakkar, V.V.;
Churchill Livingstone Verlag, Edinburgh, London
and New York.

7. Clendinnen,B.G.; Reeder,D.D.; Davidson,W.D.;
Thompson,J.C.:
Effects of Gastrointestinal Hormones on Salivation
in the Dog.
Arch. Surg. 101: 596 - 598, 1970
8. Dawes,C.; Ong,B.Y.:
Circadian Rhythmus in the Flow Rate and Proportional
Contribution of Parotid to whole Saliva Volume in man.
Arch. oral. Biol. 18: 1145 - 1153, 1973
9. Dawes,C.; Ong,B.Y.:
Circadian Rhythmus in the Concentrations of Protein
and the main Electrolytes in human unstimulated
Parotid Saliva.
Arch. oral. Biol. 18: 1233 - 1242, 1973
10. Dobrilla,G.; Valentini,M.; Fillippini,M.;
Bonoldi,M.C.; Felder,M.; Moroder,E.; Schnabl,D.;
Gaspa,U.:
Study of Parotid and Mixed Saliva in the Diagnosis
of Chronic Pancreatitis.
Digestion 19: 180 - 185, 1979
11. Eichner,H.:
Zur Sekretion der Amylase im fraktioniert gewonnenen
menschlichen Ohrspeicheldrüsensekret unter Berücksichtigung
verschiedener Bestimmungsmethoden.
Laryng. Rhinol. 58: 76 - 82, 1979
12. Eichner,H.:
Zur Proteinzusammensetzung des menschlichen Parotis-
sekretes unter Ruhe- und Reizbedingungen und seine
Veränderung bei Drüsenerkrankungen.
Fortschr. Med. 95 Jg.Nr. 23: 1522 - 1526, 1977

13. Eichner, H.; Münzel, M.; Bretzel, G.:
Vergleichende Untersuchungen von Flußraten, Elektrolyt-
und Gesamteiweißkonzentrationen und diskoelektrophore-
tische Auftrennung des Sekretes an fraktioniert gewon-
nenem Parotissekret.
Laryng. Rhinol. 54: 19 - 27, 1975
14. Eichner, H.; Eichner, V.; Fiedler, F.; Hochstraßer, K.:
Zum Sekretionsverhalten der BAEE-Esterase (Kallikrein)
im gesunden menschlichen Parotissekret unter fraktionier-
ter Abnahme bei Ruhe und Reiz.
Laryng. Rhinol. 55: 239 - 244, 1976
15. Ferguson, D.B.:
Circadian rhythm in human parotid saliva flowrate
and composition.
Arch. oral. Biol. 18: 1155 - 1173, 1973
16. Ferguson, D.B.:
Normal physiological variables, which influence
salivary flow rate and composition.
Vortrag 53. General session International Association
for Dental Research 1975 April 10-12, London
17. Forell, M.M.; Stahlheber, H.; Scholz, F.:
Galle als Reiz der Enzymsekretion des Pankreas.
Dtsch. med. Wschr. 90: 1128 - 1132, 1965
18. Freeman, M.E.:
Clinical Enzyme Unitage.
Clin. Chim. Acta 6: 300, 1961
19. Frey, E.K.; Kraut, H.; Werle, E.; Vogel, R.;
Zickgraf-Rüdel, G.; Trautschold, L.:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Enke Verlag, Stuttgart 1968

20. Garrett, J.R.; P.A. Parsons: In: Thorn, N.A.; O.H. Petersen (ed.):
Secretory mechanism of exocrine glands.
Munksgaard, Copenhagen 1974
21. Grimmel, K.; Rossbach, G.; Kaper, H.:
Amylase Activity of Parotid Saliva in Acute and
Chronic Pancreatitis.
Acta Hepato-Gastroenterol. 23: 334 - 344, 1976
22. Hokin, L.E.; Hokin, M.R.:
Biochemical aspects of excitation of protein
secretion in pancreas.
In: Sekretion und Exkretion (1965), ed. by
K.E. Wohlfahrt Bottermann, Springer Verlag,
Heidelberg
23. Jorpes, E.; Mutt, V.:
Cholestykinin (CCK). Physiologie und Anwendung.
Klin. Wschr. 48: 65 - 71, 1970
24. Kakizaki, G.; Noto, N.; Onuma, T.:
Experimental Study on the Correlation Between
the Pancreas and Parotid Gland.
Tohoku J. Exp. Med. 105: 223 - 231, 1971
25. Kakizaki, G.; Saito, T.; Sasahara, M.:
A New Diagnostic Test of Pancreatic Disorders by
Examination of Parotid Saliva.
Am. J. Gastroenterol. 65: 437 - 445, 1976
26. Kraus, F.M.; Mestecky, J.:
Immunohistological localisation of amylase,
lysozyme and immunoglobuline in the human parotid
gland.
Archs. oral. Biol. 16: 781 - 789, 1971

27. Lankisch, P.G.; Chilla, R.; Luerssen, K.; Koop, H.;
Arglebe, C.; Creutzfeld, W.:
Parotid Saliva Test in the Diagnosis of Chronic
Pancreatitis.
Digestion 19: 52 - 55, 1979
28. Levinsky, N.G.:
The Renal Kallikrein-Kinin-System
Circ. Res. 44: 441 - 451, 1979
29. Malfertheiner, P.; Fußgänger, R.; Minne, H.;
Ditschuneit, H.:
Influence of Gastrointestinal Hormons on Human
Salivary Secretion.
Horm. Metab. Res. 12: 485, 1980
30. Malfertheiner, P.:
Gastrointestinale Hormone und Speichelsekretion.
diagnostik & intensivtherapie 6: 207 - 210, 1981
31. Mangos, J.A.; Mc Sherry, N.R.; Arvanitakis, S.N.:
Autonomic regulation of secretion and transductal
fluxes of ions in the rat parotid.
Amer. J. Physiol. 225: 683 - 688, 1973
32. Mann, K.; Göring, W.; Lipp, B.; Keipert, B.; Karl, H.J.:
Radioimmunoassay of Human Urinary Kallikrein.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18: 395 - 401, 1980
33. Marder, M.Z.; Wotman, S.; Mandel, I.D.:
Salivary electrolyte changes during pregnancy.
Amer. J. Obstet. Gynecol. 112: 233 - 236, 1972
34. Menzie, J.W.; Hoffman, L.H.; Michelakis, A.M.:
Immunfluoreszent localization of renin in mouse
submaxillary gland and kidney.
Amer. Phys. Soc. 234 (5) E: 480 - 483, 1978

35. Mulcahi, H.; Fitzgerald, O.; Mc Geeney, K.F.:
Secretin and Pancreozymin Effect on Salivary
Amylase Concentration in Man.
Gut 13: 850, 1972
36. Nacchiero, M.; Dreiling, D.:
The Parotid and the Pancreas
The Effects of Secretin, CCK-PZ, and
Prostaglandin E₂ on Canine Parotid Secretion.
Mt. Sinai J. Med. (N.Y.) 45: 187 - 191, 1978
37. Nacchiero, M.; Addler, M.; Pieroni, P.; Takeshiwa, T.;
Dreiling, D.:
The Parotid and the Pancreas.
Parotid Secretion in Canine Chronic Pancreatitis.
Mt. Sinai J. Med. (N.Y.) 45: 192 - 195, 1978
38. Noronha, M.; Dreiling, D.; Bordalo, O.:
The Parotid and the Pancreas
Parotid Secretion after Secretin Stimulation
as a Screening Test of Pancreatic Dysfunction.
Am. J. Gastroenterol. 70: 282 - 285, 1978
39. Nustad, K.; Orstavik, T.B.; Gautvik, K.M.; Pierce, J.V.:
Glandular Kallikreins
Gen. Pharmac. 9: 1 - 9, 1978
40. Orstavik, T.B.:
The distribution and secretion of Kallikrein in
some exocrine organs of the rat.
Acta physiol. scand. 104: 431 - 442, 1978
41. Pawlow, I.P.:
The work of the Digestive Glands.
English ed. Griffin, London, 1910

42. Pearse, A.G.E.:
The Cytochemistry and Ultrastructure of Polypeptide
Hormone-Producing Cells of the Apud Series and the
Embryologic, Physiologic and Pathologic Implications
of the Concept.
J. Histochem. Cytochem. 17: 303 - 313, 1969
43. Prader, A.; Gautier, E.:
Na- und K- Konzentration im Speichel bei
Nebennierenstörungen.
Helv. paediat. Acta. 10: 63, 1955
44. Proud, D.; Bailey, G.S.; Nustad, K.; Gautvik, K.M.:
The immunological similarity of Rat Glandular
Kallikreins.
Biochem. J. 167: 835 - 838, 1977
45. Puskulian, L.:
Salivary Electrolyte Changes During the Normal
Menstrual Cycle.
J. dent. Res. 51: 1212 - 1216, 1972
46. Rauch, S.:
Die Speicheldrüsen des Menschen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1959
47. Richterich, R.:
Klinische Chemie
3. Auflage (1971)
Karger Verlag, Basel - München
48. Sachs, L.:
Angewandte Statistik
4. Auflage (1973)
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

49. Säuberli, H.F.; Largiadèr, F.; Vetter, W.:
Das Magenantrumhormon Gastrin.
Schweiz. med. Wschr. 104: 709 - 713, 1974

50. Shannon, I.L.; Suddick, R.P.; Dowd, F.I.:
Saliva: Composition and secretion.
Karger Verlag, Basel - München, 1974

51. Street, H.V.; Close, J.R.:
Determination of amylase activity in biological
fluids.
Clin. Chim. Acta 1: 256 - 268, 1956

52. Vogt, K.; Zahl, J.:
Über Einflüsse von Diabetes mellitus und Geschlecht
auf die Sekretion der Glandula parotis des Menschen.
Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.-und Kehlk.-Heilkunde 203:
310 - 324, 1973

53. Webster, M.E.; Mares Guia, M.; Diniz, C.R.:
Kallikreins in Glandular Tissues
in E.G. Erdös (ed.): Handbook of Experimental
Pharmacology, Vol 25 pp 135 - 155
Springer Verlag, Berlin - New York (1970)

54. Weichselbaum, T.E.:
An Accurate and Rapid Method for the Determination
of Proteins in Small Amounts of Blood Serum and Plasma.
Amer. J. clin. Path. 16 a: 40 - 49, 1946

55. Werle, E.:
History of Kallikrein and some Aspects of its
Chemistry and Physiology
in Haberland, G.L. and J.W. Rohen (ed.):
Kininogenases-Kallikrein, 1 st Symposium on
Physiological Properties and Pharmacological Rational,
F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1972

56. Werle, E.:
Entwicklungslinien und Ergebnisse der Kallikrein-
Kininforschung.
Münch. med. Wschr. 115: 225 - 230, 1973
57. Wetlaufer, D.B.:
Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids.
Adv. Prot. Chem. 17: 303 - 390, 1962

XI. Lebenslauf

Am 7. Dezember 1956 wurde ich als Sohn des Schreiners Adolf Richter und seiner Ehefrau Adelheid Richter, geb. Neumair, in Immenstadt geboren.

Von 1963 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in Altstädten, danach das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Oberstdorf, wo ich 1976 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1976 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Oktober 1982 absolvierte ich mit Erfolg die ärztliche Prüfung und erhielt am 29. Oktober 1982 die Approbation als Arzt.

Im Februar 1983 trat ich eine Assistenzarztstelle für Innere Medizin bei Herrn Chefarzt Dr. Locher in der Schloßbergklinik Oberstaufen an.

